

## PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS DA SECREÇÃO CUTÂNEA DE ANFÍBIOS DA FAUNA BRASILEIRA

*Lucas Moreira Brito (Bolsista PIBIC/CNPq), Leiz Maria Veras Miura (colaboradora, Campus Parnaíba/UFPI), José Roberto de Souza de Almeida Leite (Orientador, Campus de Parnaíba/UFPI)*

### Introdução

O Brasil ocupa a primeira colocação na relação de países com maior riqueza de anfíbios, com cerca de 946 espécies descritas, das quais 913 pertencem à ordem Anura, seguido pela Colômbia e pelo Equador (Herpetologia, 2012). Sendo o país com a maior biodiversidade de anfíbios do planeta, onde 60% das espécies de anuros são endêmicas, enfatizando assim a necessidade de sua preservação e melhor conhecimento (Mittermeier e Group, 1992; Leite, Barbosa *et al.*, 2006).

Estudos indicam que uma significativa percentagem dos anuros investigados são fontes de compostos bioativos com potencialidade para utilização em humanos, o que favorece a pesquisa de novas biomoléculas extraídas da secreção cutânea desses animais. Dentre as espécies mais estudadas destacam-se aquelas pertencentes ao gênero *Phyllomedusa*, na qual, atualmente, são conhecidas 33 espécies que estão amplamente distribuídas por várias regiões do Brasil e da América do Sul (Brand, Krause *et al.*, 2006; Frost, 2011).

Esses dados ressaltam mais uma vez, o valor da biodiversidade e coloca o Brasil num cenário muito favorável quando comparado a outro país. No entanto, para que isso se torne uma fonte real de benefícios para a sociedade, necessita-se de políticas voltadas para a geração e desenvolvimento de medicamentos próprios, e não apenas no aperfeiçoamento e produção de moléculas já existentes (Pandey, 1998).

Atualmente já foram descritas enormes quantidades de peptídeos antimicrobianos que são produzidos e secretados em uma ampla gama de organismos. O estudo detalhado da biodiversidade das secreções de anfíbios do Brasil, associado com o aprofundamento dos estudos sobre as moléculas já identificadas e primariamente estudadas por grupos de pesquisas nacionais, tem mostrado ação antimicrobiana eficiente desses produtos (Brand, Leite *et al.*, 2002).

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) têm sido pesquisados devido ao seu potencial farmacológico como agentes antibióticos seletivos e de amplo espectro, sendo ativos contra fungos filamentosos, vírus, células cancerígenas, protozoários e bactérias. A potencialidade relativa em escala micro molar associada a uma grande seletividade faz com que os peptídeos antimicrobianos de anfíbios tenham um papel privilegiado em sua classe (Brand, Leite *et al.*, 2006; Leite, Brand *et al.*, 2008).

### Metodologia

Para a extração foi proporcionada uma pequena estimulação elétrica no anuro para

ocorrer à liberação da secreção. A secreção é oriunda principalmente das glândulas granulares localizadas na região dorsal do animal. A pele é lavada com água Mili-Q e a solução é recolhida em um Recipiente seco (tubos *Falcon*) e filtrada primeiramente em um filtro de 0,45 µm posterior Filtração em um Filtro de 0,22 µm. O Extrato total filtrado é evaporado em um CENTRIVAP e depois acondicionando a -20°C.

A purificação do extrato bruto, oriunda da secreção cutânea de anfíbio, foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - SHIMADZU Prominence) utilizando uma coluna C18 (analítica Phenomenex 5µ - 250 x 460 nm), de fase reversa. A coluna foi equilibrada com 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA). O eluente utilizado foi acetonitrila com 0,1% de ácido trifluoroacético em fluxo ajustado para 1mL/min, acertando-se o comprimento de onda usado pelos detectores do HPLC para 280nm e 216nm, sendo monitorizada simultaneamente. A partir deste processo, enviou-se a amostra para a EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, para que pudesse ser determinado o grau de pureza e a massa molecular por meio de espectrometria de massa MALDI- TOF Autoflex II. Em seguida, a sequência de aminoácidos foi determinada, os peptídeos foram sintetizados e quimicamente identificados. O extrato sintetizado, após o processo de diluição de 2mg da síntese do peptídeo com 220µL de água Mili-Q, foi injetado em HPLC (Shimadzu Prominence, AUTOSAMPLE SIL-10AF, CTO-20A, LC-6AD, CBM-20A), coletando-se a fração de interesse. A amostra purificada foi analisada por espectrometria de massa para confirmar a massa molecular correspondente.

## Resultados e Discussão

O fracionamento do extrato sintetizado da secreção cutânea de *Phyllomedusa oreadese* e *Phyllomedusa hypochondrialis* por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna C18 de fase reversa resultou numa fração de alto grau de pureza entre a faixa de tempo de 38 a 40 minutos, na qual houve aumento significativo da absorbância no comprimento de onda em 216 e 280 nm, determinando o peptídeo de interesse, a dermaseptina 01 (DS 01).

Entre os PAMs, as dermaseptinas são bem conhecidas, as quais estão presentes nas glândulas granulares da subfamília Phyllomedusinae de rãs e que exibem atividade antimicrobiana considerável contra vários tipos de micro-organismos. Estes peptídeos também têm diferentes níveis de atividade contra gram-negativas e bactérias gram-positivas, fungos (incluindo leveduras) e protozoários (incluindo o gênero *Leishmania*) em concentrações micromolares. É importante notar que a maior parte das dermaseptinas têm pouca ou nenhuma atividade hemolítica contra as células de mamíferos em concentrações antimicrobianas.

As etapas posteriores deste trabalho, que seriam os testes biológicos, não puderam ser realizadas devido à falta de material (DS 01), inviabilizando a pesquisa. Entretanto, os dados coletados preliminarmente são de grande relevância para despertar o interesse futuro em pesquisas semelhantes no intuito de desenvolver novos agentes terapêuticos.

## Conclusão

Este estudo visou verificar a ação farmacológica de peptídeos oriundo da secreção cutânea de anfíbios do gênero *Phyllomedusa*, especificamente os que possuem ação antimicrobiana. Tais peptídeos, como a DS01, foram isolados em alto grau de pureza e foram coletados de anuros da região do Delta do Parnaíba. Para tal, propôs-se realizar, primeiramente, a purificação através de cromatografia líquida de alta eficiência. Entretanto, não se pôde realizar a verificação da atividade antibacteriana e a inspeção da atividade antifúngica *in vitro* através de teste com nano filmes associados a estes peptídeos devido à dificuldade ao acesso ou a falta de materiais.

Este estudo, apesar de não finalizado, veio mostrar a necessidade de maiores estudos acerca do uso da potencial biodiversidade brasileira, no que cerne aos anfíbios, como possíveis fornecedores de peptídeos para usos farmacológicos diversos.

**Apoio:** PIBIC/CNPq

## Referências

- BRAND, G. et al. Bradykinin-related peptides from *Phyllomedusa hypochondrialis*. **Peptides**, v. 27, n. 9, p. 2137-2146, 2006. ISSN 0196-9781.
- BRAND, G. D. et al. Novel dermaseptins from *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia). **Biochemical and biophysical research communications**, v. 347, n. 3, p. 739-746, 2006. ISSN 0006-291X.
- \_\_\_\_\_. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 51, p. 49332-49340, 2002. ISSN 0021-9258.
- FROST, D. **Amphibian Species of the world: an Online Reference. Version 5.5 (31 January 2011)**. American Museum of Natural History, New York 2011.
- HERPETOLOGIA, S. B. D., 2012. Disponível em: < <http://www.sbherpetologia.org.br> >. Acesso em: Agosto de 2012.
- LEITE, J.; BARBOSA, E.; NORONHA, S. Levantamento de Anuros (Amphibia) na região do Projeto Formoso-Araguaia e Arredores, Formoso do Araguaia, Tocantins, Brasil. *Sitentibus*, Ser. Ciên. **Biol**, v. 6, n. 1, p. 56-63, 2006.
- LEITE, J. R. S. A. et al. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*: Secondary structure, antimicrobial activity, and mammalian cell toxicity. **Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 151, n. 3, p. 336-343, 2008. ISSN 1095-6433.
- MITTERMEIER, R. A.; GROUP, I. S. P. S. **Lemurs of Madagascar: an action plan for their conservation, 1993-1999**. IUCN, 1992. ISBN 2831700418.
- PANDEY, R. C. Prospecting for potentially new pharmaceuticals from natural sources. **Medicinal research reviews**, v. 18, n. 5, p. 333-346, 1998. ISSN 1098-1128.

**Palavras-chave:** Anfíbios do Delta, peptídeos antimicrobianos e *Phyllomedusa*.